

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problem Mailbox.**

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



## DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

<b>(51) Classification internationale des brevets <sup>6</sup> :</b> <b>C07K 14/16, C12N 7/00</b>	<b>A1</b>	<b>(11) Numéro de publication internationale: WO 98/45323</b> <b>(43) Date de publication internationale: 15 octobre 1998 (15.10.98)</b>
<b>(21) Numéro de la demande internationale:</b> PCT/FR98/00691 <b>(22) Date de dépôt international:</b> 6 avril 1998 (06.04.98) <b>(30) Données relatives à la priorité:</b> 97/04356 9 avril 1997 (09.04.97) FR 98/02212 24 février 1998 (24.02.98) FR <b>(71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US):</b> PASTEUR SANOFI DIAGNOSTICS [FR/FR]; 3, boulevard Raymond Poincaré, F-92430 Marnes la Coquette (FR). <b>(72) Inventeurs; et</b> <b>(75) Inventeurs/Déposants (US seulement):</b> CHENEBAUX, Denis, Marie, Bernard [FR/FR]; 34, boulevard de Glatigny, F-78000 Versailles (FR). DELAGNEAU, Jean-François, Hubert [FR/FR]; 60, avenue des Gressets, F-78170 La Celle Saint Cloud (FR). GADELLE, Stéphane, Jean, Xavier [FR/FR]; Chemin de la Pature, F-91570 Bièvres (FR). RIE- UNIER, François, Yves [FR/FR]; 6, chemin des Gravières, F-78330 Fontenay le Fleury (FR). <b>(74) Mandataire:</b> LE GUEN, Gérard; Cabinet Lavoix, 2, place d'Estienne d'Orves, F-75441 Paris Cedex 09 (FR).		<b>(81) Etats désignés:</b> AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, GH, GM, GW, HU, ID, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW, brevet ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), brevet eurasiatique (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG).  <b>Publiée</b> <i>Avec rapport de recherche internationale.</i> <i>Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des</i> <i>revendications, sera republiée si des modifications sont</i> <i>reçues.</i>
<b>(54) Title:</b> SYNTHETIC PEPTIDES USEFUL IN BIOLOGICAL ASSAYS FOR DETECTING INFECTIONS CAUSED BY GROUP O HIV-1 VIRUSES <b>(54) Titre:</b> PEPTIDES SYNTHETIQUES UTILISABLES DANS LES ESSAIS BIOLOGIQUES POUR LA DETECTION DES INFECTIONS DUES AUX VIRUS VIH-1 DU GROUPE O <b>(57) Abstract</b> <p>The invention concerns peptides used in biological assays for detecting infections caused by group O HIV-1 viruses, the method for preparing them, compositions and kits containing such peptides and the biological assays using such peptides.</p> <b>(57) Abrégé</b> <p>L'invention concerne des peptides synthétiques trouvant leur application dans les essais biologiques de détection des infections dues aux virus VIH-1 du groupe O, leur procédé de préparation, des compositions et des trousseaux contenant de tels peptides ainsi que les essais biologiques mettant en oeuvre de tels peptides.</p>		

# **UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION**

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AL	Albanie	ES	Espagne	LS	Lesotho	SI	Slovénie
AM	Arménie	FI	Finlande	LT	Lituanie	SK	Slovaquie
AT	Autriche	FR	France	LU	Luxembourg	SN	Sénégal
AU	Australie	GA	Gabon	LV	Lettonie	SZ	Swaziland
AZ	Azerbaïdjan	GB	Royaume-Uni	MC	Monaco	TD	Tchad
BA	Bosnie-Herzégovine	GE	Géorgie	MD	République de Moldova	TG	Togo
BB	Barbade	GH	Ghana	MG	Madagascar	TJ	Tadjikistan
BE	Belgique	GN	Guinée	MK	Ex-République yougoslave de Macédoine	TM	Turkménistan
BF	Burkina Faso	GR	Grèce	ML	Mali	TR	Turquie
BG	Bulgarie	HU	Hongrie	MN	Mongolie	TT	Trinité-et-Tobago
BJ	Bénin	IE	Irlande	MR	Mauritanie	UA	Ukraine
BR	Brésil	IL	Israël	MW	Malawi	UG	Ouganda
BY	Bélarus	IS	Islande	MX	Mexique	US	Etats-Unis d'Amérique
CA	Canada	IT	Italie	NE	Niger	UZ	Ouzbékistan
CF	République centrafricaine	JP	Japon	NL	Pays-Bas	VN	Viet Nam
CG	Congo	KE	Kenya	NO	Norvège	YU	Yougoslavie
CH	Suisse	KG	Kirghizistan	NZ	Nouvelle-Zélande	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	République populaire démocratique de Corée	PL	Pologne		
CM	Cameroun	KR	République de Corée	PT	Portugal		
CN	Chine	KZ	Kazakhstan	RO	Roumanie		
CU	Cuba	LC	Sainte-Lucie	RU	Fédération de Russie		
CZ	République tchèque	LI	Liechtenstein	SD	Soudan		
DE	Allemagne	LK	Sri Lanka	SE	Suède		
DK	Danemark	LR	Libéria	SG	Singapour		
EE	Estonie						

- 1 -

Peptides synthétiques utilisables dans les essais biologiques pour  
la détection des infections dues aux virus VIH 1 du groupe O.

L'invention concerne des peptides synthétiques utilisables dans les essais biologiques pour la détection des infections dues aux virus VIH-1 du groupe O, leur procédé de préparation, des compositions et des trousseaux contenant de tels peptides ainsi que les essais biologiques mettant en oeuvre de tels peptides.

5

Des rétrovirus VIH-1 du groupe O sont connus dans l'art antérieur. Le brevet EP 0 345 375 et la demande de brevet EP 0 657 532 décrivent les isolats ANT 70 et ANT 70 NA isolés chez des malades Camerounais. Ces documents décrivent plus précisément des antigènes et des compositions antigéniques  
10 contenant des lysats ou des protéines de ces isolats, les acides nucléiques correspondant à l'ARN génomique, des méthodes d'hybridation mettant en oeuvre ces acides nucléiques, des méthodes de production des isolats dénommés ci-dessus ainsi que des procédés de préparation de protéines p12, p16, p25, gp41, gp120 de ces rétrovirus.

15 La demande EP 0 591 914 décrit l'isolat MVP 5180/91. Cet isolat caractérisé par Western Blot présente, comme l'isolat précédent, des différences par rapport aux isolats du rétrovirus VIH-1 connus depuis longtemps. La demande EP 0 591 914 décrit précisément la séquence d'ADN de l'isolat MVP 5180/91 et indique précisément la localisation des gènes gag, pol et env. La  
20 demande EP 0 591 914 décrit encore des peptides synthétiques de la boucle V3 ainsi que de la région immunodominante (gp41). Ces derniers sont utiles pour des essais biologiques, notamment pour la détection, *in vitro*, des anticorps VIH-1 du groupe O.

25 La demande EP 0 673 948 décrit des peptides synthétiques ou recombinés constitués de 15 à 50 acides aminés (AA) et comportant la séquence  
-VWGIRQLRRLQALETLIQNQQRLNLWGXXGKLIXYTSVKWNTSWSGR- dans laquelle X représente soit un résidu de cystéine, soit un résidu de sérine. Ces  
30 peptides sont utiles dans le domaine diagnostique pour la détection des infections dues à certains isolats de rétrovirus VIH-1 du groupe O.

On connaît également la demande EP 0 727 483 qui décrit l'isolat MVP 2901/94 qui fait aussi partie des rétrovirus appartenant à la famille VIH-1 du  
35 groupe O. Cette demande décrit certains antigènes ayant des séquences peptidiques bien déterminées. Ces séquences peptidiques correspondent à une partie de la séquence de la gp120 et une partie de la gp41 (région immunodominante) de l'isolat MVP 2901/94.

La demande WO 96/12809 décrit deux nouveaux isolats appartenant à la famille VIH-1 du groupe O. Il s'agit des isolats VAU et DUR. Cette demande décrit certaines séquences peptidiques issues des deux virus cités ci-dessus, utiles pour la détection d'anticorps reconnaissant les séquences peptidiques

5 VIH-1 VAU ou DUR.

La demande WO 96/32293 décrit deux antigènes issus de la séquence de l'isolat ANT 70. Il s'agit de l'antigène appelé MDL061 et de l'antigène MDL056, de la région immunodominante de la gp41. Selon cette invention, pour détecter

10 100% des échantillons d'une collection limitée de sérums de malades infectés par le virus de VIH-1 du groupe O, il est nécessaire d'utiliser des compositions contenant ces deux peptides, puisque chaque peptide isolé ne permet pas à lui seul d'obtenir des résultats satisfaisants.

En effet, il est quasi impossible, au regard de la variabilité génétique révélée par les isolats du virus du groupe O, de garantir le dépistage sérologique des individus contaminés par la mise en oeuvre d'antigènes issus du même et unique isolat. Cela signifie qu'il n'est pas possible d'obtenir des réactifs qui garantissent 100% de sensibilité. Le groupe O ainsi soulève pour la

15 première fois un problème important ; il s'agit de l'inadéquation de certains réactifs sérologiques à reconnaître des individus contaminés par des groupes ou sous-types particulièrement divergents. C'est le cas justement des VIH1 du groupe O.

20

La demande WO 96/40763 insiste aussi sur la grande divergence du groupe O. Cette demande décrit des peptides qui incorporent, dans une séquence naturelle VIH-1 de type B, quelques petites modifications (remplacement d'un ou de deux acides aminés). Selon cette demande, ces peptides hybrides sont capables de réagir avec des anticorps anti groupe O.

25

La demande WO 96/27013 décrit une série de nouveaux virus VIH1 du groupe O désignés BCF 01, BCF 02, BCF 03, BCF06, BCF 07, BCF 08, BCF09, BCF11, BCF12, BCF13 et BCF14 ainsi qu'une série de peptides de la région dominante de la gp41 correspondante dénommés ESS/BCF02, FAN/BCF01,

30 LOB/BCF06, MAN/BCF07, NKO/BCF08, POC/BCF03, NAN/BCF11, BCF09, BCF12, BCF13 et BCF14. Un certain nombre de ces peptides sont peu maniables en diagnostic à cause de leur faible solubilité, notamment le peptide BCF13.

De manière inattendue, il a été maintenant trouvé que certains peptides synthétiques sont des réactifs diagnostiques de qualité supérieure et permettent de dépister de manière satisfaisante les malades infectés par les rétrovirus VIH-1 du groupe O. Ces peptides sont composés de séquences variables articulées  
 5 autour de courtes séquences très conservées, présentes dans les isolats des rétrovirus VIH-1 du groupe O. Les peptides de l'invention permettent d'obtenir des résultats bien supérieurs à ceux obtenus avec des peptides synthétiques porteurs d'épitopes immunodominants de la gp41 (env) de certains isolats VIH-1 du groupe O.

10

Par la suite, pour dénommer les acides aminés, on utilisera la nomenclature à trois lettres.

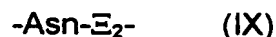
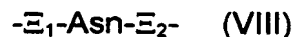
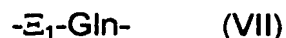
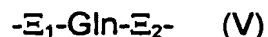
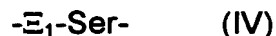
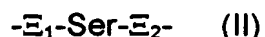
Les peptides synthétiques de l'invention répondent à la formule  
 15 générale (I) :



dans laquelle :

- $\Delta$  représente un radical biotinyle, un radical biocytinyle, un atome  
 20 d'hydrogène, un radical acétyle ( $\text{CH}_3\text{CO-}$ ), une chaîne aliphatique pouvant contenir une ou deux fonctions thiol, aldéhyde ou amine, la chaîne aliphatique étant de préférence une chaîne alkyle de 1 à 6 atomes de carbone ou une chaîne alcényle de 2 à 6 atomes de carbone, ou une chaîne aminoalkylcarbonyle de 2 à 6 atomes de carbone,

25 -Z représente une séquence peptidique d'une des formules (II) à (X) :

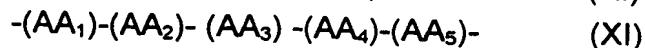


35

dans lesquelles :

- $\Xi_1$  représente une séquence peptidique de 0 à 9 acides aminés  
 et

$-\Xi_2$  représente une séquence peptidique de 0 à 5 acides aminés,  
 $-\Theta$  représente une séquence peptidique de formule (XI) :



dans laquelle :

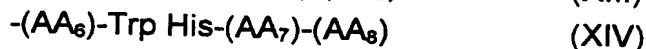
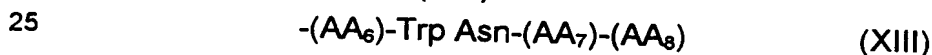
- 5
- $(AA_1)$  représente soit un résidu lysine, soit un résidu arginine, soit un résidu ornithine,
  - $(AA_2)$  représente soit un résidu glycine, soit un résidu asparagine,
  - $(AA_3)$  représente soit un résidu lysine, soit un résidu arginine, soit un résidu ornithine,
- 10
- $(AA_4)$  représente soit un résidu leucine, soit un résidu alanine, soit un résidu isoleucine, soit un résidu glutamine,
  - $(AA_5)$  représente soit un résidu isoleucine, soit un résidu valine, soit un résidu leucine, soit un résidu thréonine, soit un résidu norleucine, soit un résidu norvaline,
- 15
- à condition toutefois que  $(AA_1)$ ,  $(AA_2)$ ,  $(AA_3)$ ,  $(AA_4)$  et  $(AA_5)$  ne forment jamais ensemble les séquences peptidiques -Lys Gly Lys Leu Ile- et -Lys Gly Lys Leu Val-,

$-\Omega$ , fixé sur le groupe  $-\text{CO}-$  de la sérine représente :

- 20
- un radical hydroxyle  $(-\text{OH})$  ou un radical amino  $(-\text{NH}_2)$ ,
  - un radical alcoxy comportant de 1 à 6 atomes de carbone,
  - une séquence peptidique de formule (XII) :



dans laquelle  $\Sigma$  représente une séquence de formule (XIII) ou de formule (XIV) :



dans lesquelles :

- 30
- $(AA_6)$  représente un acide aminé différent de la lysine,
  - $(AA_7)$  représente un acide aminé,
  - $(AA_8)$  représente un résidu sérine ou thréonine,
- et  $\Psi$  fixé sur le reste  $-\text{CO}-$  de l'acide aminé  $AA_8$  libre, représente un groupe  $\text{OH}$ ,  $\text{NH}_2$  ou un radical alcoxy comportant de 1 à 6 atomes de carbone,
- 35
- une séquence peptidique de formule (XV) :



dans laquelle  $\Psi$  fixé sur le reste  $-\text{CO}-$  de la valine, a la même signification que pour la formule (XII),



- ou une séquence peptidique d'une des formules (XVI) à (XVIII) :

-Z-TrpGlyCys-Θ-CysTyrThrSer-Ψ (XVI)

Val-Σ-Z-TrpGlyCys-Θ-CysTyrThrSerVal-Σ-Ψ (XVII)

Val-Z-TrpGlyCys-Θ-CysTyrThrSerVal-Ψ (XVIII)

5 dans lesquelles Z et Θ ont la définition donnée pour la formule (I) et Σ a la définition donnée pour la formule (XII) et Ψ fixé sur le reste -CO- de la sérine, sur le reste -CO- de l'acide aminé AA<sub>5</sub> ou sur le reste -CO- de la valine, a la même signification que pour la formule (XII).

10

Lorsque Ω représente une séquence peptidique d'une des formules (XVI) à (XVIII), le peptide de formule (I) devient un dimère, dont la taille peut varier de 26 à 66 acides aminés. Lorsque Ω ne représente pas une séquence peptidique d'une des formules (XVI) à (XVIII), les peptides de formule (I) sont de type  
15 monomère et leur taille peut varier de 13 à 33 acides aminés.

Les peptides selon l'invention peuvent être soit sous forme linéaire, soit sous forme cyclisée par l'intermédiaire de ponts disulfures inter-cystéines.

20 On préfère les composés de formule (I) dans laquelle (AA<sub>5</sub>) représente soit un résidu valine, soit un résidu leucine, soit un résidu thréonine, et lorsque Ω correspond à une séquence peptidique de formule (XII), (AA<sub>6</sub>) représente soit un résidu glutamine, soit un résidu arginine.

25 On préfère les peptides de formule (I) dans laquelle :

-Δ représente un radical biotinyle, un atome d'hydrogène, ou une chaîne aliphatique pouvant contenir une ou deux fonctions thiol, aldéhyde ou amine, la chaîne aliphatique étant de préférence une chaîne alkyle de 1 à 6 atomes de carbone, ou une chaîne aminoalkylcarbonyle de 2 à 6 atomes de carbone,

30 -Z représente une séquence peptidique de formule (II) ou (V), dans lesquelles Ξ<sub>1</sub> représente une séquence peptidique de deux acides aminés et Ξ<sub>2</sub> représente un acide aminé, ou une séquence de formule (IV), dans laquelle Ξ<sub>1</sub> représente trois acides aminés, ou une séquence peptidique de formule (VIII), dans laquelle Ξ<sub>1</sub> représente une séquence peptidique de neuf, huit ou trois  
35 acides aminés et Ξ<sub>2</sub> une séquence peptidique de cinq acides aminés,

-Θ représente une séquence peptidique de formule :

-Lys Gly Arg Leu Val-,

-Arg Gly Lys Ala Val-,

- Arg Gly Arg Leu Val-,

ou

-Arg Gly Arg Ala Val-,

et

- 5 - $\Omega$  représente un groupe hydroxyle, la séquence peptidique (XV) ou une des séquences suivantes qui correspondent à la séquence peptidique de formule (XII) :

- Val Arg Trp Asn Glu Thr- $\Psi$ ,

- Val Gln Trp Asn Glu Thr- $\Psi$

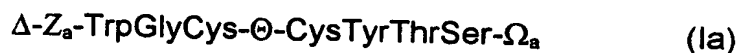
10 ou

- Val Gln Trp Asn Ser Thr- $\Psi$ .

De préférence Z représente une séquence peptidique de formule :

- -Leu Leu Ser Ser-
  - -Leu Leu Asn Ser-
  - 15 • -Leu Leu Gln Ser-
  - -Arg Leu Asn Ser-
  - -Ala Leu Glu Thr Leu Leu Gln Asn Gln Gln Leu Leu Asn Ser-
  - -Ala Leu Glu Thr Leu Leu Gln Asn Gln Gln Leu Leu Asp Leu-
  - -Ala Leu Glu Thr Leu Leu Gln Asn Gln Gln Leu Leu Asn Ile-
  - 20 • -Leu Asn Gln Gln Arg Leu Leu Asn Ser-
- ou
- -Arg Ala Leu Glu Thr Leu Leu Asn Gln Gln Arg Leu Leu Asn Ser-

Font également partie de l'invention, les peptides synthétiques comportant  
25 de 20 à 50 acides aminés et répondant à la formule (Ia) :



dans laquelle  $Z_a$  représente un radical de formules IIa à Xa :

- |    |                                |         |
|----|--------------------------------|---------|
| 30 | $\Xi_{1a}\text{-Ser-}\Xi_{2a}$ | (IIa)   |
|    | -Ser- $\Xi_{2a}$               | (IIIa)  |
|    | - $\Xi_{1a}\text{-Ser}$        | (IVa)   |
|    | $\Xi_{1a}\text{-Gln-}\Xi_{2a}$ | (Va)    |
|    | -Gln- $\Xi_{2a}$               | (VIa)   |
| 35 | $\Xi_{1a}\text{-Gln-}$         | (VIIa)  |
|    | $\Xi_{1a}\text{-Asn-}\Xi_{2a}$ | (VIIIa) |
|    | -Asn- $\Xi_{2a}$               | (IXa)   |
|    | - $\Xi_{1a}\text{-Asn}$        | (Xa)    |

dans lesquelles :

- $\Xi_{1a}$  représente une séquence peptidique de 1 à 5 acides aminés et

5 - $\Xi_{2a}$  un acide aminé,

- $\Omega_a$  représente une séquence peptidique de formule (XII), telle que définie pour la formule (I), ou une séquence peptidique de formule (XVIIa) :

10 Val- $\Sigma$ -Z<sub>a</sub>-TrpGlyCys- $\Theta$ -CysTyrThrSerVal- $\Sigma$ - $\Psi$  (XVIIa)

dans laquelle Z<sub>a</sub> a la définition donnée pour la formule (Ia) et

15  $\Delta$ ,  $\Theta$ ,  $\Sigma$  et  $\Psi$  ont la même signification que pour la formule (I).

On préfère les peptides de formule (I) ou (Ia) incluant l'une des séquences suivantes (ces peptides peuvent être de type dimère ou de type monomère comme défini précédemment). Les séquences sont données selon les nomenclatures à une et à trois lettres :

20

Séquence N° 1

-LLSLWGCRGKAVCYTSVQWNET-

ou

-Leu Leu Ser Leu Trp Gly Cys Arg Gly Lys Ala Val Cys Tyr Thr Ser Val Gln Trp Asn

25       1                       5                       10                       15                       20  
Glu Thr-  
          22

30 Séquence N° 2

-LLSLWGCRGRLVCYTSVQWNET-

ou

-Leu Leu Ser Leu Trp Gly Cys Arg Gly Arg Leu Val Cys Tyr Thr Ser Val Gln Trp Asn

35       1                       5                       10                       15                       20  
Glu Thr-  
          22

Séquence N° 3

-LLSSWGCKGRLVCYTSVQWNET-

ou

-Leu Leu Ser Ser Trp Gly Cys Lys Gly Arg Leu Val Cys Tyr Thr Ser Val Gln Trp Asn

5      1                      5                      10                      15                      20

Glu Thr-

22

10 Séquence N° 4

-LLSSWGCKGRLVCYTSVQWNST-

ou

-Leu Leu Ser Ser Trp Gly Cys Lys Gly Arg Leu Val Cys Tyr Thr Ser Val Gln Trp Asn

1                      5                      10                      15                      20

15 Ser Thr-

22

Séquence N° 5

20 -LLQSWGCKGRLVCYTSVQWNST-

ou

-Leu Leu Gln Ser Trp Gly Cys Lys Gly Arg Leu Val Cys Tyr Thr Ser Val Gln Trp Asn

1                      5                      10                      15                      20

Ser Thr-

25      22

Séquence N° 6

-LLNSWGCRGKAVCYTSVQWNET-

30 ou

-Leu Leu Asn Ser Trp Gly Cys Arg Gly Lys Ala Val Cys Tyr Thr Ser Val Gln Trp Asn

1                      5                      10                      15                      20

Glu Thr-

22

35

Séquence N° 7

-LLSLWGCRGRAVCYTSVQWNET-

ou

9

-Leu Leu Ser Leu Trp Gly Cys Arg Gly Arg Ala Val Cys Tyr Thr Ser Val Gln Trp Asn  
 1 5 10 15 20

Glu Thr-

22

5

Séquence N° 8

-LLSSWGCRGRLVCYTSVQWNET-

ou

10 -Leu Leu Ser Ser Trp Gly Cys Arg Gly Arg Leu Val Cys Tyr Thr Ser Val Gln Trp Asn  
 1 5 10 15 20

Glu Thr-

22

15

Séquence N° 9 :

-LLSSWGCKGRLVCYTS-

ou

-Leu Leu Ser Ser Trp Gly Cys Lys Gly Arg Leu Val Cys Tyr Thr Ser-

20 1 5 10 15

Séquence N° 10 :

-LLNSWGCKGRLVCYTS-

25 ou

-Leu Leu Asn Ser Trp Gly Cys Lys Gly Arg Leu Val Cys Tyr Thr Ser-

1 5 10 15

30 Séquence N° 11 :

-ALETLLQNQQLLSWGCRGRLVCYTSVRWNET-

ou

-Ala Leu Glu Thr Leu Leu Gln Asn Gln Gln Leu Leu Asn Ser Trp Gly Cys Arg Gly

1 5 10 15

35 Arg Leu Val Cys Tyr Thr Ser Val Arg Trp Asn Glu Thr-

20 25 30

10

Séquence N° 12 :

-ALETLLQNQQLLNIWGCRGRLVCYTSVRWNET-

ou

-Ala Leu Glu Thr Leu Leu Gln Asn Gln Gln Leu Leu Asn Ile Trp Gly Cys Arg Gly

5      1                      5                      10                      15

Arg Leu Val Cys Tyr Thr Ser Val Arg Trp Asn Glu Thr-

20                      25                      30

10 Séquence N° 13 :

-ALETLLQNQQLLDLWGCRGRLVCYTSVRWNET-

ou

-Ala Leu Glu Thr Leu Leu Gln Asn Gln Gln Leu Leu Asp Leu Trp Gly Cys Arg Gly

1                      5                      10                      15

15 Arg Leu Val Cys Tyr Thr Ser Val Arg Trp Asn Glu Thr-

20                      25                      30

Séquence N° 14 :

20 -LNQQRLLNSWGCKGRLVCYTSV-

ou

-Leu Asn Gln Gln Arg Leu Leu Asn Ser Trp Gly Cys Lys Gly Arg Leu Val Cys Tyr

1                      5                      10                      15

Thr Ser Val-

25 20

Séquence N° 15 :

-RALETLLNQQRLLNSWGCKGRLVCYTSV-

30 ou

- Arg Ala Leu Glu Thr Leu Leu Asn Gln Gln Arg Leu Leu Asn Ser Trp Gly Cys Lys

1                      5                      10                      15

Gly Arg Leu Val Cys Tyr Thr Ser Val-

20                      25

35

Séquence N° 16 :

-RLNSWGCKGRLVCYTSV-

ou

- Arg Leu Asn Ser Trp Gly Cys Lys Gly Arg Leu Val Cys Tyr Thr Ser Val-

5	1	5	10	15
---	---	---	----	----

## Les peptides synthétiques

ci-après sont des peptides particulièrement préférés :

10 PEPTIDE N° 1 (2B) : SEQ ID N° 1

LLSLWGCRGKAVCYTSVQWNET

ou

Leu Leu Ser Leu Trp Gly Cys Arg Gly Lys Ala Val Cys Tyr Thr Ser Val Gln Trp Asn

1	5	10	15	20
15	Glu Thr			
	22			

PEPTIDE N° 2 (3B) : SEQ ID N° 2

20 LLSLWGCRGRLVCYTSVQWNET

ou

Leu Leu Ser Leu Trp Gly Cys Arg Gly Arg Leu Val Cys Tyr Thr Ser Val Gln Trp Asn

1	5	10	15	20
15	Glu Thr			
25	22			

PEPTIDE N° 3 (4B) : SEQ ID N° 3

30 LLSSWGCKGRLVCYTSVQWNET

ou

Leu Leu Ser Ser Trp Gly Cys Lys Gly Arg Leu Val Cys Tyr Thr Ser Val Gln Trp Asn

1	5	10	15	20
35	Glu Thr			
	22			

PEPTIDE N° 4 (5B) : SEQ ID N° 4

LLSSWGCKGRLVCYTSVQWNST

ou

12

Leu Leu Ser Ser Trp Gly Cys Lys Gly Arg Leu Val Cys Tyr Thr Ser Val Gln Trp Asn  
 1 5 10 15 20

Ser Thr

22

5

PEPTIDE N° 5 (6B) : SEQ ID N° 5

LLQSWGCKGRLVCYTSVQWNST

ou

10 Leu Leu Gln Ser Trp Gly Cys Lys Gly Arg Leu Val Cys Tyr Thr Ser Val Gln Trp Asn  
 1 5 10 15 20

Ser Thr

22

15 PEPTIDE N° 6 : SEQ ID N° 6

LLNSWGCRGKAVCYTSVQWNET

ou

Leu Leu Asn Ser Trp Gly Cys Arg Gly Lys Ala Val Cys Tyr Thr Ser Val Gln Trp Asn  
 1 5 10 15 20

20 Glu Thr

22

PEPTIDE N° 7 : SEQ ID N° 7

25 LLSLWGCRGRAVCYTSVQWNET

ou

Leu Leu Ser Leu Trp Gly Cys Arg Gly Arg Ala Val Cys Tyr Thr Ser Val Gln Trp Asn  
 1 5 10 15 20

Glu Thr

30 22

PEPTIDE N° 8 (7B) : SEQ ID N° 8

LLSSWGCRGRLVCYTSVQWNET

ou

35 Leu Leu Ser Ser Trp Gly Cys Arg Gly Arg Leu Val Cys Tyr Thr Ser Val Gln Trp Asn  
 1 5 10 15 20

Glu Thr

22



13

PEPTIDE N° 9 (12B) : SEQ ID N° 9

LLSSWGCKGRLVCYTS

ou

Leu Leu Ser Ser Trp Gly Cys Lys Gly Arg Leu Val Cys Tyr Thr Ser

5      1                      5                      10                      15

PEPTIDE N° 10 (14B) : SEQ ID N° 10

LLNSWGCKGRLVCYTS

10 ou

Leu Leu Asn Ser Trp Gly Cys Lys Gly Arg Leu Val Cys Tyr Thr Ser

1                      5                      10                      15

15 PEPTIDE N° 11 (18B) : SEQ ID N° 11

ALETLLQNQQLLNSWGCRGRLVCYTSVRWNET

ou

Ala Leu Glu Thr Leu Leu Gln Asn Gln Gln Leu Leu Asn Ser Trp Gly Cys Arg Gly

1                      5                      10                      15

20 Arg Leu Val Cys Tyr Thr Ser Val Arg Trp Asn Glu Thr

20                      25                      30

PEPTIDE N° 12 (19B) : SEQ ID N°12

25 ALETLLQNQQLLNIWGCRGRLVCYTSVRWNET

ou

Ala Leu Glu Thr Leu Leu Gln Asn Gln Gln Leu Leu Asn Ile Trp Gly Cys Arg Gly

1                      5                      10                      15

Arg Leu Val Cys Tyr Thr Ser Val Arg Trp Asn Glu Thr

30 20                      25                      30

PEPTIDE N° 13 (20B) : SEQ ID N° 13

ALETLLQNQQLLDLWGCRGRLVCYTSVRWNET

35 ou

14

-Ala Leu Glu Thr Leu Leu Gln Asn Gln Gln Leu Leu Asp Leu Trp Gly Cys Arg Gly  
 1 5 10 15  
 Arg Leu Val Cys Tyr Thr Ser Val Arg Trp Asn Glu Thr  
 20 25 30

5

PEPTIDE N° 14 (21B) : SEQ ID N° 14

LNQQRLLNSWGCKGRLVCYTSV

ou

10 Leu Asn Gln Gln Arg Leu Leu Asn Ser Trp Gly Cys Lys Gly Arg Leu Val Cys Tyr  
 1 5 10 15  
 Thr Ser Val  
 20

15

PEPTIDE N° 15 (22B) : SEQ ID N° 15

RALETLLNQQRLLNSWGCKGRLVCYTSV

ou

20 Arg Ala Leu Glu Thr Leu Leu Asn Gln Gln Arg Leu Leu Asn Ser Trp Gly Cys Lys  
 1 5 10 15  
 Gly Arg Leu Val Cys Tyr Thr Ser Val  
 20 25

25 PEPTIDE N° 16 (23B) : SEQ ID N° 16

RLNSWGCKGRLVCYTSV

ou

Arg Leu Asn Ser Trp Gly Cys Lys Gly Arg Leu Val Cys Tyr Thr Ser Val  
 1 5 10 15

30

Les peptides synthétiques de formule (I), objet de la présente invention, peuvent être obtenus par synthèse en phase solide selon des méthodes classiques : R.B. Merrifield, *J. Amer. Chem. Soc.* (1963), 85, pp. 2149-2154 ; R.C. Sheppard, in « *Peptides 1971* », Nesvadba H. (ed.) North Holland, Amsterdam, pp. 111 ; E. Atherton and R.L. Sheppard, in « *Solid phase peptide synthesis, a practical approach* », IRL PRESS, (1989), Oxford University Press, pp. 25-34. Comme synthétiseur automatique, on peut utiliser le synthétiseur « 9050 Plus Pep Synthesizer » de Millipore ou un synthétiseur équivalent.

Le support solide, utilisé pour les synthèses, doit être compatible avec la technique et la chimie utilisées. Par exemple, pour une synthèse sur le synthétiseur « 9050 Plus pep. Synthesizer », il est recommandé d'utiliser une résine adaptée à la technique dite « en flux continu » ; les résines PEG PS 5 répondent à ces critères. Ces supports sont constitués d'un bras (« spacer ») à base de polyéthylène glycol (PEG) situé entre le groupement fonctionnel des billes de polystyrène et le point d'accrochage du premier acide aminé. La nature de ce point d'ancrage peut varier selon la fonction C-terminale choisie. Dans le cas présent, différentes résines PEG-PS ont été utilisées.

10

La résine de départ et les acides aminés utilisés comme matières premières sont des produits disponibles dans le commerce (PerSeptive-Biosystem, ou Néosystem).

15 Pour la synthèse peptidique, les groupements protecteurs de chaînes latérales suivants ont été utilisés :

Acides aminés	Groupement protecteur
Arginine	Pentaméthyl-2,2,4,6,7-dihydrobenzofurane-5-sulfonyl (Pbf)
Asparagine, Glutamine	Trityle (Trt)
Cystéine	Trityle (Trt) ou Acétamidométhyle (Acm)
Sérine, Thréonine, Tyrosine	Ether tert-butyle (tBu)
Lysine, Tryptophane	Tert-butyloxycarbonyl (Boc)

20 La protection temporaire de la fonction amine primaire en  $\alpha$  des acides aminés utilisée est le groupement 9-fluorénylméthoxyloxycarbonyl (Fmoc). La déprotection est effectuée par une solution de pipéridine à 20% en diméthylformamide.

25 Pour le couplage, on utilise de préférence un excès de diisopropylcarbodiimide (DIPCDI) et d'hydroxy-1-benzotriazole (HOBt).

Après synthèse, la résine est lavée avec des solvants organiques, (diméthylformamide, puis dichlorométhane) séchée sous vide puis traitée par une solution à base d'acide trifluoroacétique (TFA) refroidie à 0°C et contenant

des « scavengers » appropriés. On peut utiliser, par exemple, le réactif K contenant 82% d'acide trifluoroacétique, 5% de ph' nol, 5% d'eau, 5% de thioanisole et 3% d'éthanedithiol.

Après filtration de la résine, les peptides synthétiques sont précipités et  
5 rincés à l'éther.

Les peptides synthétiques sont ensuite purifiés par chromatographie liquide en phase inverse et leur pureté est déterminée par spectrométrie de masse. Comme phase solide, on peut utiliser, par exemple, la phase Bondapak  
10 C-18. Les peptides sont élués en réalisant un gradient linéaire entre deux solutions tampons, le premier essentiellement aqueux (par exemple eau-TFA 0,1 %) et le second plutôt organique (par exemple un mélange contenant d'acétonitrile 60 %, eau 39,92 % et TFA 0,08 %). Les fractions pures collectées sont rassemblées, concentrées sous vide et lyophilisées.

15 Pour la cyclisation, les peptides synthétiques purifiés sont dissous dans une solution d'acétate d'ammonium (10mM). Le pH est ajusté à 8,5 par addition d'ammoniaque 1 M. La solution est vigoureusement agitée. La cyclisation est complète après 18 heures. Le pH est ensuite abaissé à 6 par addition d'acide  
20 acétique. Les peptides cyclisés sont lyophilisés, puis purifiés par chromatographie liquide en phase inverse comme cela a été décrit précédemment.

L'immunoréactivité des peptides de l'invention a été évaluée à l'aide de  
25 sérums de malades majoritairement d'origine camerounaise infectés par des rétrovirus VIH-1 du groupe O. Les différents essais effectués ont démontré que les peptides de l'invention, seuls ou en association (compositions de peptides), permettent de détecter 100% des sérums infectés par des rétrovirus VIH-1 du groupe O.

30 Les peptides synthétiques de l'invention trouvent donc leur application dans les tests immunologiques pour le dépistage des infections dues aux rétrovirus VIH-1 groupe O. Il est également possible d'utiliser des associations de plusieurs peptides synthétiques de formule I. Ces associations, qui peuvent  
35 contenir deux ou plusieurs peptides de formule I, font aussi partie de l'invention. On préfère des associations contenant les peptides N°1(2B) et N°3(4B).

Il est également possible d'utiliser des peptides synthétiques de formule (I) de la présente invention en association avec des peptides recombinés (protéines recombinantes) VIH-1 du groupe O tels qu'ils peuvent être obtenus par des méthodes classiques et ayant les séquences décrites par exemple dans la demande EP 0 591 914. De telles compositions entrent aussi dans le cadre de la présente invention.

Les peptides synthétiques de l'invention peuvent être également utilisés en association avec d'autres peptides synthétiques ou recombinés VIH-1 (protéines recombinantes) et/ou VIH-2, tels que les peptides décrits dans les demandes de brevets ou brevets EP 0 387 914, EP 0 239 425, EP 0 220 273, ou EP 0 267 802. Cette liste de demandes de brevets ou brevets n'est pas exhaustive et est donnée à titre d'exemple.

Les compositions contenant un ou plusieurs peptides synthétiques de formule (I) et un ou plusieurs peptides synthétiques ou recombinés VIH-1 ou VIH-2 trouvent leur application en diagnostic pour le dépistage de malades infectés par différents rétrovirus VIH. Ces compositions font également partie de la présente invention.

Des procédés d'immunodosage utilisant un ou plusieurs peptides synthétiques de formule (I), seuls ou en association avec des peptides recombinés VIH-1 du groupe O ou des peptides synthétiques ou recombinés VIH-1 et/ou VIH-2, font également partie de l'invention.

L'invention vise également des trousse, pour la mise en oeuvre d'immunodosages, qui incluent un peptide de formule (I) ou une composition qui contient au moins un peptide de formule (I).

Les exemples suivants illustrent l'invention et sont donnés à titre non limitatif.

#### **EXEMPLE 1 :**

##### **Préparation d'un composé selon l'invention : PEPTIDE N° 2 (3B)**

LLSLWGCRGRLVCYTSVQWNET

ou

Leu Leu Ser Leu Trp Gly Cys Arg Gly Arg Leu Val Cys Tyr Thr Ser Val Gln Trp Asn

1

5

10

15

20

Glu Thr

22

Ce peptide a été synthétisé en phase solide. La technique mise au point en 1963 par Merrifield (*J. Am. Chem. Soc.* (1963) 85, pp. 2149-2154) consiste à fixer le premier acide aminé sur un support solide polymérique (résine) par sa fonction acide et à allonger la séquence peptidique à partir de ce premier acide aminé, le peptide en cours de synthèse restant ancré sur la résine.

Pour la synthèse du peptide n° 2, ont été utilisés, comme synthétiseur, le synthétiseur « 9050 Plus Pep Synthetizer » et comme résine, la résine Fmoc Thr (OtBu) PEG PS.

Les différentes étapes de la synthèse sont résumées dans le tableau I ci-après :

Tableau I

RESIDU ACIDE AMINE	PROTECTION NH <sub>2</sub>	PROTECTION LATERALE	METHODE DE COUPLAGE	NOMBRE D'EQ - DUREE DE COUPLAGE
Glu	Fmoc	OtBu	DIPCDI/HOBt	5 eq - 30 min
Asn	Fmoc	Trt	DIPCDI/HOBt	5 eq - 30 min
Trp	Fmoc	Boc	DIPCDI/HOBt	5 eq - 30 min
Gln	Fmoc	Trt	DIPCDI/HOBt	5 eq - 30 min
Val	Fmoc		DIPCDI/HOBt	5 eq - 30 min
Ser	Fmoc	tBu	DIPCDI/HOBt	5 eq - 30 min
Thr	Fmoc	tBu	DIPCDI/HOBt	5 eq - 30 min
Tyr	Fmoc	tBu	DIPCDI/HOBt	5 eq - 30 min
Cys	Fmoc	Trt	DIPCDI/HOBt	5 eq - 30 min
Val	Fmoc		DIPCDI/HOBt	5 eq - 30 min
Leu	Fmoc		DIPCDI/HOBt	5 eq - 30 min
Arg	Fmoc	Pbf	DIPCDI/HOBt	5 eq - 30 min
Gly	Fmoc		DIPCDI/HOBt	5 eq - 30 min
Arg	Fmoc	Pbf	DIPCDI/HOBt	5 eq - 30 min
Cys	Fmoc	Trt	DIPCDI/HOBt	5 eq - 30 min
Gly	Fmoc		DIPCDI/HOBt	5 eq - 30 min
Trp	Fmoc	Boc	DIPCDI/HOBt	5 eq - 30 min
Leu	Fmoc		DIPCDI/HOBt	5 eq - 30 min
Ser	Fmoc	tBu	DIPCDI/HOBt	5 eq - 30 min
Leu	Fmoc		DIPCDI/HOBt	5 eq - 30 min
Leu	Fmoc		DIPCDI/HOBt	5 eq - 30 min

Après la fin de la synthèse, la résine a été lavée avec du diméthylformamide, puis du dichlorométhane et séchée sous vide.

Ensuite, la résine a été traitée avec du réactif K (acide trifluoacétique 82 % ; phénol 5 % ; eau 5 % ; thioanisole 5 %; éthanedithiol 3 %). Le peptide N° 2 (3B), isolé par précipitation à l'aide de diéthyle oxyde, a été ensuite rincé avec le même solvant. On a ainsi obtenu 140 mg du peptide N° 2 (3B).

Le peptide N° 2 (3B) a été ensuite purifié par chromatographie liquide en phase inverse. Comme phase solide, il a été utilisé la phase Bondapak C-18. Le peptide a été élué en réalisant un gradient linéaire entre deux solutions tampons, le premier essentiellement aqueux (par exemple eau-TFA 0,1 %) et le second plutôt organique (par exemple un mélange contenant : acétonitrile 60 %, eau 39,92 % et TFA 0,08 %). Les fractions pures collectées ont été rassemblées, concentrées sous vide et lyophilisées.

Pour la cyclisation, le peptide synthétique purifié, ainsi obtenu a été dissous dans une solution d'acétate d'ammonium (10mM). Le pH a été ajusté à 8,5 par addition d'ammoniaque 1 M. La solution a été vigoureusement agitée. La cyclisation a été complète après 18 heures. Le pH a été ensuite abaissé à 6 par addition d'acide acétique. Le peptide cyclisé a été lyophilisé, puis purifié par chromatographie liquide en phase inverse comme cela a été décrit précédemment.

#### Préparation d'un composé selon l'invention : PEPTIDE N° 15 (22B)

Ce peptide a été synthétisé comme le peptide N° 2 (3B), mais en utilisant comme résine, la résine FmocPAL PEG-PS.

Les différentes étapes de la synthèse sont résumées dans le tableau II ci-après :

Tableau II

RESIDU ACIDE AMINE	PROTECTION NH <sub>2</sub>	PROTECTION LATERALE	METHODE DE COUPLAGE	NOMBRE D'EQ - DUREE DE COUPLAGE
Val	Fmoc		DIPCDI/HOBt	5 eq - 45 mn
Ser	Fmoc	tBu	DIPCDI/HOBt	5 eq - 45 mn
Thr	Fmoc	tBu	DIPCDI/HOBt	5 eq - 45 mn
Tyr	Fmoc	tBu	DIPCDI/HOBt	5 eq - 45 mn
Cys	Fmoc	Trt	DIPCDI/HOBt	5 eq - 45 mn
Val	Fmoc		DIPCDI/HOBt	5 eq - 45 mn
Leu	Fmoc		DIPCDI/HOBt	5 eq - 45 mn
Arg	Fmoc	Pbf	DIPCDI/HOBt	5 eq - 45 mn
Gly	Fmoc		DIPCDI/HOBt	5 eq - 45 mn
Lys	Fmoc	Boc	DIPCDI/HOBt	5 eq - 45 mn
Cys	Fmoc	Trt	DIPCDI/HOBt	5 eq - 45 mn
Gly	Fmoc		DIPCDI/HOBt	5 eq - 45 mn
Trp	Fmoc	Boc	DIPCDI/HOBt	5 eq - 45 mn
Ser	Fmoc	tBu	DIPCDI/HOBt	5 eq - 45 mn
Asn	Fmoc	Trt	DIPCDI/HOBt	5 eq - 45 mn
Leu	Fmoc		DIPCDI/HOBt	5 eq - 45 mn
Leu	Fmoc		DIPCDI/HOBt	5 eq - 45 mn
Arg	Fmoc	Pbf	DIPCDI/HOBt	5 eq - 45 mn
Gln	Fmoc	Trt	DIPCDI/HOBt	5 eq - 45 mn
Gln	Fmoc	Trt	DIPCDI/HOBt	5 eq - 45 mn
Asn	Fmoc	Trt	DIPCDI/HOBt	5 eq - 45 mn
Leu	Fmoc		DIPCDI/HOBt	5 eq - 45 mn
Leu	Fmoc		DIPCDI/HOBt	5 eq - 45 mn
Thr	Fmoc	tBu	DIPCDI/HOBt	5 eq - 45 mn
Glu	Fmoc	OtBu	DIPCDI/HOBt	5 eq - 45 mn
Leu	Fmoc		DIPCDI/HOBt	5 eq - 45 mn
Ala	Fmoc		DIPCDI/HOBt	5 eq - 45 mn
Arg	Fmoc	Pbf	DIPCDI/HOBt	5 eq - 45 mn



Après la fin de la synthèse, la résine a été lavée avec du diméthylformamide, puis du dichlorométhane et séchée sous vide.

Ensuite, la résine a été traitée avec du réactif K (acide trifluoracétique 82 % ; phénol 5 % ; eau 5 % ; thioanisole 5 % ; éthanedithiol 3 %). Le peptide  
 5 N°7 (22B) isolé par précipitation à l'aide d'oxyde de diéthyle, a été ensuite rincé avec le même solvant. On a ainsi obtenu 140 mg du peptide N° 15 (22B) .

Le peptide N° 15 (22B) a été ensuite purifié par chromatographie liquide en phase inverse, puis cyclisé, lyophilisé et purifié comme décrit précédemment  
 10 pour le peptide N° 2 (3B).

De manière équivalente, et en utilisant les résines et acides aminés appropriés, les autres composés de l'invention ont été synthétisés.

15 Le tableau III indique le poids moléculaire de certains peptides de formule (I), sous forme non cyclisée, évalué par spectrométrie de masse.

**Tableau III**

Peptide N°	Poids moléculaire (Daltons)
1 (2B)	2512
2 (3B)	2583
3 (4B)	2528
4 (5B)	2586
5 (6B)	2527
9 (12B)	1772
10 (14B)	1799
11 (18B)	3752
12 (19B)	3778
13 (20B)	3780
14 (21B)	2538
15 (22B)	3222
16 (23B)	1941

**EXEMPLE 2 :****Evaluation de l'immunoréactivité des peptides selon l'invention par test immuno-enzymatique : Essai n° 1**

5 Les sérums utilisés ESS, DUR, VAU et HAD sont des sérums de malades français infectés par des rétrovirus VIH-1 du groupe O. Les autres échantillons de sérums de malades infectés par des rétrovirus VIH-1 groupe O ont été obtenus par le Centre Pasteur de Yaoundé au Cameroun et ont été sérotypés groupe O selon l'algorithme sérologique décrit dans *AIDS (1977)*, 11, pp 445-  
10 453.

Les sérums VIH négatifs (n=48) ont été obtenus à partir de volontaires sains.

15 Les peptides synthétiques utilisés ont été dissous dans l'eau à une concentration de 1 mg/ml (solution mère). Pour l'étape de sensibilisation de la phase solide (coating), 110 µl d'une solution à 2 µg/ml de chaque peptide (obtenue par dilution de la solution mère avec de la solution tampon carbonate 0,1 M) ont été ajoutés à chaque cupule des plaques de microtitrage Microtiter™  
20 (NUNC). Après incubation pendant une nuit à température ambiante, les microplaques ont été d'abord lavées avec une solution tampon Tris NaCl pH 7,4 contenant 0,1% de Tween® 20 et du merthiolate de sodium 0,001%, puis saturées avec une solution de PBS contenant 0,5% de Régilait™ (lait écrémé desséché). Après aspiration de la solution de saturation, les plaques ont été  
25 chauffées pendant 10 min à 50°C.

Les échantillons de sérums ont été dilués au 1/5 avec une solution de lait écrémé (tampon citrate additionné de 0,01% de rouge de phénol, de chloroforme à 0,25% et de Kathon® à 0,25%), déposés sur les cupules des plaques et mis à  
30 incuber pendant 30 min à 40°C.

Après lavage avec une solution tampon Tris NaCl pH 7,4 contenant 0,1% de Tween® 20 et du merthiolate de sodium à 0,001%, 100 µl d'une solution de conjugué anticorps de chèvre anti IgG et IgM humaines marqués à la  
35 peroxydase du raifort, contenant comme conservateur 0,01% de merthiolate de sodium, en solution dans une solution tampon citrate additionné de glycérol à 30% et du sérum normal de veau foetal à 25% ont été ajoutés à chaque cupule de plaques puis ces dernières ont été mises à incuber pendant 30 min à 40°C.

Après lavage avec une solution tampon Tris NaCl pH 7,4 contenant 0,1% de Tween® 20 et du merthiolate de sodium à 0,001%, le développement de la coloration a été obtenu par addition, dans chaque cupule, de 100 µl de O-phenylène diamine en solution dans du peroxyde d'hydrogène. Les microplaques ont été ensuite mises à incuber pendant 30 min à température ambiante et dans l'obscurité. La réaction colorée a ensuite été arrêtée par addition de 100 µl d'acide sulfurique 4N. L'absorbance (A) a été déterminée à 490 et 620 nm.

L'absorbance relative (A490-A620) lue dans chaque cupule est proportionnelle à l'immunoréactivité de chaque peptide. Cela indique l'aptitude de chaque peptide à réagir avec l'échantillon biologique avec lequel est effectué l'essai. La valeur seuil (cut-off) a été déterminée comme étant une absorbance égale à 0.15. Elle correspond à la moyenne de valeurs négatives (n=48) plus 12 écart-types.

La réactivité des peptides de l'invention, (peptide n° 3 (4B), peptide n° 2 (3B) et peptide n° 1 (2B) tous sous forme cyclisée) a été comparée à celle de deux peptides synthétiques ayant comme séquence une partie de la séquence naturelle de l'enveloppe (env) de l'isolat VAU (rétrovirus VIH-1 du groupe O) et comportant un épitope immunodominant de gp41.

Ces deux peptides ont la séquence suivante :

VAU 22 AA

Leu Leu Asn Leu Trp Gly Cys Lys Asn Arg Ala Ile Cys Tyr Thr Ser Val Lys Trp Asn  
 1 5 10 15 20  
 Lys Thr  
 22

VAU 35 AA

Arg Leu Leu Ala Leu Glu Thr Phe Ile Glu Glu Asn Glu Leu Leu Asn Leu Trp Gly Cys  
 1 5 10 15 20  
 Lys Asn Arg Ala Ile Cys Tyr Thr Ser Val Lys Trp Asn Lys Thr  
 25 30 35

Pour l'étude, ces peptides ont été utilisés sous forme cyclisée. Les résultats de cette étude sont indiqués dans le tableau IV.

Tableau IV

SERUM	ABSORBANCE				
	PEPTIDE N° 3 (4B)	PEPTIDE N° 2 (3B)	PEPTIDE N° 1 (2B)	VAU 22 AA	VAU 35 AA
ESS*	>**	>	2,494	>	>
DUR*	>	>	>	0,118	0,872
HAD	>	0,518	0,041	0,789	0,871
VAU*	1,342	>	>	>	>
3935	>	0,893	0,307	0,138	0,227
6891	>	0,614	0,062	0,359	0,496
6512*	0,746	0,785	>	0,120	0,174
1105*	1,421	1,031	>	0,099	0,129
4021*	0,430	0,119	>	0,050	1,957
5969*	>	0,282	>	2,491	>
2700	>	0,274	>	>	>
5453	0,555	0,081	>	1,267	1,482
5931	>	>	>	0,202	2,225
3136	>	0,992	0,302	>	>
3653	1,352	>	0,044	1,441	1,322
2352	>	>	0,205	>	>
3016	>	>	0,243	>	>
3302	>	>	0,386	>	>
2294	>	>	0,447	>	>
3771	>	>	0,544	>	>
1581	>	>	>	1,112	0,894
5373	>	>	>	1,359	0,856
7443	>	>	>	0,920	0,574
3637	>	>	>	0,779	1,647
6295*	1,718	1,063	>	0,972	>
6689*	0,710	>	>	>	>
1754	>	>	>	1,263	1,948
4489*	>	>	>	1,318	1,718
4364	>	>	1,382	>	>
3884*	>	>	1,839	>	>
3529	>	>	1,803	>	>
3482	2,402	>	1,473	>	>
1702	>	>	1,162	>	>
6487	>	1,017	2,687	2,889	2,891
5164	>	>	>	>	>
5766*	>	>	>	>	>
3945	>	>	>	>	>

5      \*      sérotypés / génotypés  
       \*\*      > = signal supérieur à la capacité de lecture du spectrophotomètre.

Tableau IV (suite)

SERUM	ABSORBANCE				
	PEPTIDE N° 3 (4B)	PEPTIDE N° 2 (3B)	PEPTIDE N° 1 (2B)	VAU-22 AA	VAU 35 AA
4434	>	>	>	2,273	>
4288*	>	>	2,802	2,337	N.T.***
6782	>	2,091	2,462	2,190	2,214
2313	>	>	>	>	>
2312	>	>	>	>	>
1062	>	>	>	>	>
402	>	>	>	>	>
134	>	>	>	>	>
7120	>	>	>	>	>
7212	>	>	>	>	>
6976*	>	>	>	>	>
3600*	>	>	2,743	>	>
3236	>	>	>	>	>
3235	>	>	>	>	>
2551	>	>	>	>	>
5270*	>	>	>	>	>
5210	>	>	>	>	>
5149*	>	>	>	>	>
4477	>	>	>	2,511	>
3891	>	>	2,780	>	>
3627*	>	>	2,910	>	>
7258*	>	>	2,477	>	>
7007	2,136	2,334	>	>	2,151
6697	>	>	>	>	>
6998	>	>	>	>	>
6627	>	>	>	>	>
6198*	>	>	>	>	>
6165	>	>	2,714	>	>
7439	>	>	>	>	>
7297*	>	>	>	>	>
6111	>	>	>	>	>
625	>	>	>	>	2,885

5

- \* sérotypés / génotypés  
 \*\* > = signal supérieur à la capacité de lecture du spectrophotomètre.  
 \*\*\* Non testé

Les résultats du tableau IV démontrent que le peptide n° 3 (4B) présente les meilleures performances au regard de celles relevées pour les autres peptides. Ce peptide permet la meilleure discrimination des sérums de malades infectés par des rétrovirus VIH-1 du groupe O par rapport aux deux peptides  
5 ayant une partie de la séquence de l'isolat VAU correspondant à l'épitope immunodominant de la gp41. Par ailleurs, les peptides n° 2 (3B) et n° 1 (2B) de l'invention sont plus immunoréactifs que le peptide VAU 22 AA qui comporte le même nombre d'acides aminés.

10

**EXEMPLE 3 :****Evaluation par test immunoenzymatique de l'immunoréactivité des peptides selon l'invention : Essai n° 2**

15

Les échantillons de sérums de malades infectés par des rétrovirus VIH-1 du groupe O ont été obtenus par le Centre Pasteur de Yaoundé au Cameroun et ont été serotypés groupe O selon l'algorithme sérologique décrit dans *AIDS* (1977), 11, pp. 445-453. Un échantillon (Maryland) génotypé provient des Etats-  
20 Unis. Ces échantillons ont été préalablement dilués en sérum humain négatif aux dilutions données dans le tableau V, afin de disposer d'un volume suffisant pour les différents essais d'immunoréactivité.

Les peptides synthétiques utilisés ont été dissous dans l'eau à une  
25 concentration de 1 mg/ml (solution mère). Pour l'étape de sensibilisation de la phase solide (« coating »), il a été procédé comme cela a été décrit pour l'exemple 2.

Les échantillons de sérums ont été dilués au 1/5 avec une solution de lait  
30 écrémé (en tampon citrate additionné de rouge de phénol à 0,01%, de chloroforme à 0,25% et de Kathon® à 0,25%), déposés dans les cupules des plaques et mis à incuber pendant 30 min à 40°C.

Après lavage avec une solution tampon Tris NaCl pH 7,4 contenant 0,1%  
35 de Tween® 20 et du merthiolate d sodium à 0,001%, 100 µl d'une solution de conjugué d'anticorps de chèvre anti IgG et IgM humaines marqués à la peroxydase du raifort, contenant comme conservateur du merthiolate de sodium à 0,01%, en solution dans une solution tampon citrate additionnée de glycérol à

30% et du sérum normal de veau foetal à 25%, ont été ajoutés à chaque cupule des plaques puis ces dernières ont été mises à incuber pendant 30 mn à 40°C.

- 5 Après lavage avec une solution tampon Tris NaCl pH 7,4 contenant du Tween® 20 à 0,1% et du merthiolate de sodium à 0,001%, le développement de la coloration a été obtenu comme cela a été décrit dans l'exemple 2.

- 10 L'absorbance (DO) relative (A490-A620) lue dans chaque cupule est proportionnelle à l'immunoréactivité de chaque peptide. Cela indique l'aptitude de chaque peptide à réagir avec l'échantillon biologique avec lequel est effectué l'essai.

- 15 La réactivité des peptides de l'invention, peptides N° 10 (14B), N° 11 (18B), N° 12 (19B), N° 14 (21B), N° 15 (22B), N° 16 (23B) tous sous forme cyclisée, a été comparée à celle de trois peptides synthétiques homologues, ayant comme séquence une partie de la séquence naturelle de l'enveloppe (env) de rétrovirus VIH-1 du groupe O. Ces peptides sont deux peptides dérivés de l'isolat VAU, -le peptide VAU 22 AA et le peptide VAU 35 AA- et le peptide MVP 5180 (désigné « MVP 5180 » dans le tableau V). Les peptides VAU 22 AA et VAU 35 AA (dont la structure est indiquée dans l'exemple 2) et le peptide MVP 5180 comportent un épitope immunodominant de la gp41.

- 25 Tous ces peptides ont été utilisés sous forme cyclisée. La séquence du peptide MVP 5180 est la suivante :

MVP 5180

	Arg	Leu	Gln	Ala	Leu	Glu	Thr	Leu	Ile	Gln	Asn	Gln	Gln	Arg	Leu	Asn	Leu	Trp	Gly	Cys
	1				5					10				15					20	
30	Lys	Gly	Lys	Leu	Ile	Cys	Tyr	Thr	Ser	Val	Lys	Trp	Asn	Thr	Ser					
					25					30				35						

Les résultats de cette étude sont indiqués dans le tableau V.

Tableau V

SERUM	PEPTIDES *								
	N° 10	N° 11	N° 12	N° 14	N° 15	N° 16	MVP 5180	VAU 35 AA	VAU 22 AA
	ABSORBANCE (DO)								
4280 au 1/50	0,022	0,686	0,201	0,286	0,689	0,033	0,382	0,013	0,021
NGO au 1/50	0,067	0,335	0,193	0,157	0,315	0,110	0,184	0,055	0,040
NJEM au 1/100	0,032	0,811	0,391	0,277	0,939	0,025	0,146	0,159	0,024
MBASSI au 1/100	1,217	1,150	0,747	2,134	2,010	2,683	0,248	0,120	0,257
WANG au 1/50	0,698	0,234	0,124	2,397	2,680	1,290	0,075	0,025	0,041
258 OUDI au 1/100	0,587	0,373	0,226	0,764	1,184	1,692	0,116	0,058	0,100
DO15 au 1/100	1,613	0,859	1,286	3,357	3,693	3,038	0,673	0,036	0,075
DJOU au 1/100	1,268	0,482	0,419	1,998	2,088	2,166	0,203	0,022	0,042
3600 au 1/100	0,482	0,360	0,249	0,716	0,801	0,933	0,206	0,025	0,058
3613 au 1/400	1,108	0,837	0,773	1,508	1,627	1,679	0,478	0,250	0,396
6111 au 1/100	0,596	0,348	0,202	0,850	1,207	1,009	0,226	0,087	0,180
625 au 1/50	0,838	0,338	0,264	2,045	2,122	1,791	0,202	0,069	0,165
Maryland au 1/400	0,524	0,370	0,285	0,734	0,844	1,229	0,241	0,054	0,168
3653 au 1/10	0,347	0,337	0,247	0,072	0,380	0,406	0,401	0,021	0,310

PHASE SOLIDE\* : PEPTIDE 2µg/ml

5

Pour chaque peptide testé, les échantillons ont été rangés en quatre classes (a, b, c, et d) correspondant à divers niveaux d'absorbance relative lue aux longueurs d'onde A492-A620 :

- pour a :  $DO < 0,100$ ,
- pour b :  $0,100 < DO < 0,500$ ,
- - pour c :  $0,500 < DO < 1,000$ ,
- - pour d :  $DO > 1,000$ ,

10



permettant ainsi d'évaluer le degré d'immunoréactivité des peptides. Les peptides les plus immunoréactifs sont ceux pour lesquels le plus grand nombre d'échantillons est trouvé dans les classes correspondant aux absorbances les plus élevées.

5 Les résultats sont indiqués dans le tableau VI.

Tableau VI

CLASSE	PEPTIDES *								
	N° 10	N° 11	N° 12	N° 14	N° 15	N° 16	MVP 5180	VAU 35 AA	VAU 22 AA
	Nombre d'échantillons								
a	3	0	0	1	0	2	1	11	7
b	2	9	11	3	2	2	12	3	7
c	5	4	2	4	4	1	1	0	0
d	4	1	1	6	8	9	0	0	0

PHASE SOLIDE\* : PEPTIDE 2µg/ml

10

Les résultats montrent que tous les peptides de l'invention testés réalisent une meilleure performance en immunoréactivité que les peptides de référence de l'art antérieur qui dérivent d'isolats naturels (MVP 5180, VAU). Les peptides de l'invention N° 15 (22B), N° 14 (21B), et N° 16 (23B) s'avèrent les plus immunoréactifs.

15

#### EXEMPLE 4 :

#### Evaluation de l'immunoréactivité des compositions contenant d s peptides selon l'invention par test immuno-enzymatique.

20

Pour cet essai, il a été procédé selon le protocole décrit dans l'exemple 2 et les mêmes sérums ont été utilisés. Les microplaques utilisées ont été sensibilisées soit avec le peptide N° 1 (2B) cyclisé, soit avec le peptide N° 3 (4B) cyclisé, soit avec une composition contenant ces deux peptides (1:1 p/p). Dans chaque cupule ont été déposés, soit 100 µl d'une solution contenant 2 µg/ml de peptide N° 1 (2B), soit 100 µl d'une solution contenant 2 µg/ml de peptide N° 3 (4B), soit 100 µl d'une solution contenant 1 µg/ml de peptide N° 1 (2B) et 1 µg/ml de peptide N° 3 (4B).

30

Les résultats de cet essai sont donnés dans le tableau VII.

Tableau VII

SERUM	ABSORBANCE		
	PEPTIDE N° 1 (2B) (2 µg/ml )	PEPTIDE N° 3 (4B) (2 µg/ml )	PEPTIDE N° 1 (2B) (1µg/ml ) + PEPTIDE N° 3 (4B) (1 µg /ml )
3529	1,803	>*	>
1105	>	1,421	>
3891	2,780	>	>
3235	>	>	>
2700	>	>	>
5931	>	>	>
3935	0,307	>	>
7443	>	>	>
1062	>	>	>
1754	>	>	>
3136	0,302	>	>
6891	0,062	>	>
5149	>	>	>
5270	>	>	>
2551	>	>	>
3600	2,743	>	>
6976	>	>	>
4489	>	>	>
6165	2,714	>	>
6198	>	>	>
6627	>	>	>
6998	>	>	>
6697	>	>	>
7258	2,477	>	>
3627	2,910	>	>
4477	>	>	>
3771	0,544	>	>
1702	1,016	>	>
2294	0,447	>	>
2352	0,205	>	>
3016	0,243	>	>
3302	0,386	>	>
3482	1,473	>	>
3653	0,044	1,322	1,105
4364	1,382	>	>
3637	>	>	>
4288	2,802	>	>
5969	>	>	>
258	>	>	>
6111	>	>	>

\* > = signal supérieur à la capacité de lecture du spectrophotomètre.

Tableau VII (suite)

SERUM	ABSORBANCE		
	PEPTIDE N° 1 (2B) ( 2 µg/ml )	PEPTIDE N° 3 (4B) ( 2 µg/ml )	PEPTIDE N° 1 (2B) ( 1µg/ml ) + PEPTIDE N° 3 (4B) ( 1 µg /ml )
625	>	>	>
6853	>	2,769	>
3136	0,302	>	>
6689	>	0,710	>
6295	>	1,718	>
4021	>	0,430	2,381
3884	1,839	>	>
6512	>	0,746	>
6487	2,687	>	>
ESS	2,494	>	>
HAD	0,041	>	>
DUR	>	>	>

5 \* > = signal supérieur à la capacité de lecture du spectrophotomètre.

Les résultats du tableau VII démontrent que les compositions des peptides de l'invention, lorsque utilisées en diagnostic permettent la détection de tous les sérums de malades infectés par des rétrovirus VIH-1 du groupe O.

## LISTE DE SEQUENCES

## (1) INFORMATION GENERALE:

## (i) DEPOSANT:

- (A) NOM: Pasteur Sanofi Diagnostics
- (B) RUE: 3 boulevard Raymond Poincaré
- (C) VILLE: Marnes la Coquette
- (E) PAYS: France
- (F) CODE POSTAL: 92430
- (G) TELEPHONE: 0153774000
- (H) TELECOPIE: 0153774133

(ii) TITRE DE L' INVENTION: peptides synthétiques utilisables dans les  
essais biologiques pour la détection des infections dues  
au virus VIH-1 du groupe O

(iii) NOMBRE DE SEQUENCES: 16

## (iv) FORME LISIBLE PAR ORDINATEUR:

- (A) TYPE DE SUPPORT: Floppy disk
- (B) ORDINATEUR: IBM PC compatible
- (C) SYSTEME D' EXPLOITATION: PC-DOS/MS-DOS
- (D) LOGICIEL: PatentIn Release #1.0, Version #1.25 (OEB)

## (2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 1:

## (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 22 acides aminés
- (B) TYPE: acide aminé

(ii) TYPE DE MOLECULE: peptide

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 1:

Leu Leu Ser Leu Trp Gly Cys Arg Gly Lys Ala Val Cys Tyr Thr Ser  
1                      5                      10                      15

Val Gln Trp Asn Glu Thr  
20

## (2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 2:

## (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 22 acides aminés
- (B) TYPE: acide aminé

(ii) TYPE DE MOLECULE: peptide

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 2:

Leu Leu Ser Leu Trp Gly Cys Arg Gly Arg Leu Val Cys Tyr Thr Ser  
1 5 10 15  
Val Gln Trp Asn Glu Thr  
20

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 3:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:  
(A) LONGUEUR: 22 acides aminés  
(B) TYPE: acide aminé

(ii) TYPE DE MOLECULE: peptide

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 3:

Leu Leu Ser Ser Trp Gly Cys Lys Gly Arg Leu Val Cys Tyr Thr Ser  
1 5 10 15  
Val Gln Trp Asn Glu Thr  
20

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 4:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:  
(A) LONGUEUR: 22 acides aminés  
(B) TYPE: acide aminé

(ii) TYPE DE MOLECULE: peptide

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 4:

Leu Leu Ser Ser Trp Gly Cys Lys Gly Arg Leu Val Cys Tyr Thr Ser  
1 5 10 15  
Val Gln Trp Asn Ser Thr  
20

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 5:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:  
(A) LONGUEUR: 22 acides aminés  
(B) TYPE: acide aminé

(ii) TYPE DE MOLECULE: peptide

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 5:

Leu Leu Gln Ser Trp Gly Cys Lys Gly Arg Leu Val Cys Tyr Thr Ser  
1 5 10 15  
Val Gln Trp Asn Ser Thr

20

## (2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 6:

## (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 22 acides aminés

(B) TYPE: acide aminé

## (ii) TYPE DE MOLECULE: peptide

## (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 6:

Leu	Leu	Asn	Ser	Trp	Gly	Cys	Arg	Gly	Lys	Ala	Val	Cys	Tyr	Thr	Ser
1				5					10					15	

Val	Gln	Trp	Asn	Glu	Thr
			20		

## (2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 7:

## (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 22 acides aminés

(B) TYPE: acide aminé

## (ii) TYPE DE MOLECULE: peptide

## (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 7:

Leu	Leu	Ser	Leu	Trp	Gly	Cys	Arg	Gly	Arg	Ala	Val	Cys	Tyr	Thr	Ser
1				5					10					15	

Val	Gln	Trp	Asn	Glu	Thr
			20		

## (2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 8:

## (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 22 acides aminés

(B) TYPE: acide aminé

## (ii) TYPE DE MOLECULE: peptide

## (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 8:

Leu	Leu	Ser	Ser	Trp	Gly	Cys	Arg	Gly	Arg	Leu	Val	Cys	Tyr	Thr	Ser
1				5					10					15	

Val	Gln	Trp	Asn	Glu	Thr
			20		

## (2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 9:

## (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 16 acides aminés

(B) TYPE: acide aminé

(ii) TYPE DE MOLECULE: peptide

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 9:

Leu	Leu	Ser	Ser	Trp	Gly	Cys	Lys	Gly	Arg	Leu	Val	Cys	Tyr	Thr	Ser
1				5				10						15	

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 10:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 16 acides aminés

(B) TYPE: acide aminé

(ii) TYPE DE MOLECULE: peptide

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 10:

Leu	Leu	Asn	Ser	Trp	Gly	Cys	Lys	Gly	Arg	Leu	Val	Cys	Tyr	Thr	Ser
1				5				10						15	

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 11:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 32 acides aminés

(B) TYPE: acide aminé

(ii) TYPE DE MOLECULE: peptide

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 11:

Ala	Leu	Glu	Thr	Leu	Leu	Gln	Asn	Gln	Gln	Leu	Leu	Asn	Ser	Trp	Gly
1				5				10						15	

Cys	Arg	Gly	Arg	Leu	Val	Cys	Tyr	Thr	Ser	Val	Arg	Trp	Asn	Glu	Thr
			20					25					30		

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 12:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 32 acides aminés

(B) TYPE: acide aminé

(ii) TYPE DE MOLECULE: peptide

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 12:

Ala Leu Glu Thr Leu Leu Gln Asn Gln Gln Leu Leu Asn Ile Trp Gly  
 1 5 10 15  
 Cys Arg Gly Arg Leu Val Cys Tyr Thr Ser Val Arg Trp Asn Glu Thr  
 20 25 30

## (2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 13:

## (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 32 acides aminés  
 (B) TYPE: acide aminé

## (ii) TYPE DE MOLECULE: peptide

## (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 13:

Ala Leu Glu Thr Leu Leu Gln Asn Gln Gln Leu Leu Asp Leu Trp Gly  
 1 5 10 15  
 Cys Arg Gly Arg Leu Val Cys Tyr Thr Ser Val Arg Trp Asn Glu Thr  
 20 25 30

## (2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 14:

## (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 22 acides aminés  
 (B) TYPE: acide aminé

## (ii) TYPE DE MOLECULE: peptide

## (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 14:

Leu Asn Gln Gln Arg Leu Leu Asn Ser Trp Gly Cys Lys Gly Arg Leu  
 1 5 10 15  
 Val Cys Tyr Thr Ser Val  
 20

## (2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 15 :

## (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 28 acides aminés  
 (B) TYPE: acide aminé

## (ii) TYPE DE MOLECULE: peptide

## (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 15 :

Arg Ala Leu Glu Thr Leu Leu Asn Gln Gln Arg Leu Leu Asn Ser Trp  
 1 5 10 15



Gly Cys Lys Gly Arg Leu Val Cys Tyr Thr Ser Val  
20 25

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 16 :

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 17 acides aminés

(B) TYPE: acide aminé

(ii) TYPE DE MOLECULE: peptide

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 16:

Arg Leu Asn Ser Trp Gly Cys Lys Gly Arg Leu Val Cys Tyr Thr Ser  
1 5 10 15  
Val

**REVENDICATIONS**

1. Peptides synthétiques de type monomère de 13 à 33 acides aminés ou de type dimère de 26 à 66 acides aminés, sous forme linéaire ou sous forme cyclisée par l'intermédiaire de ponts disulfures inter-cystéines, répondant à la formule générale (I) :



- 10 dans laquelle :

- $\Delta$  représente un radical biotinyle, un radical biocytinyle, un atome d'hydrogène, un radical acétyle ( $\text{CH}_3\text{CO-}$ ), une chaîne aliphatique pouvant contenir une ou deux fonctions thiol, aldéhyde ou amine, la chaîne aliphatique étant de préférence une chaîne alkyle de 1 à 6 atomes de carbone ou une chaîne alcényle de 2 à 6 atomes de carbone, ou une chaîne aminoalkylcarbonyle de 2 à 6 atomes de carbone,

-Z représente une séquence peptidique d'une des formules (II) à (X) :

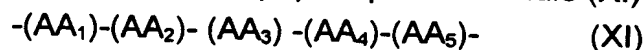
- |    |                           |        |
|----|---------------------------|--------|
|    | - $\Xi_1$ -Ser- $\Xi_2$ - | (II)   |
|    | -Ser- $\Xi_2$ -           | (III)  |
| 20 | - $\Xi_1$ -Ser-           | (IV)   |
|    | - $\Xi_1$ -Gln- $\Xi_2$ - | (V)    |
|    | -Gln- $\Xi_2$ -           | (VI)   |
|    | - $\Xi_1$ -Gln-           | (VII)  |
|    | - $\Xi_1$ -Asn- $\Xi_2$ - | (VIII) |
| 25 | -Asn- $\Xi_2$ -           | (IX)   |
|    | $\Xi_1$ -Asn-             | (X)    |

dans lesquelles :

- 30 - $\Xi_1$  représente une séquence peptidique de 0 à 9 acides aminés et

- $\Xi_2$  représente une séquence peptidique de 0 à 5 acides aminés,

- $\Theta$  représente une séquence peptidique de formule (XI) :



dans laquelle :

- 35 • ( $\text{AA}_1$ ) représente soit un résidu lysine, soit un résidu arginine, soit un résidu ornithine,
- ( $\text{AA}_2$ ) représente soit un résidu glycine, soit un résidu asparagine,

- (AA<sub>3</sub>) représente soit un résidu lysine, soit un résidu arginine, soit un résidu ornithine.

(AA<sub>4</sub>) représente soit un résidu leucine, soit un résidu alanine, soit un résidu isoleucine, soit un résidu glutamine.

- (AA<sub>5</sub>) représente soit un résidu isoleucine, soit un résidu valine, soit un résidu leucine, soit un résidu thréonine, soit un résidu norleucine, soit un résidu norvaline,

à condition toutefois que  $(AA_1)$ ,  $(AA_2)$ ,  $(AA_3)$ ,  $(AA_4)$  et  $(AA_5)$  ne forment jamais ensemble les séquences peptidiques

**-Lys Gly Lys Leu Ile- et -Lys Gly Lys Leu Val-,**

**-Ω, fixé sur le groupe -CO- de la sérine représente :**

- un radical hydroxyle (-OH) ou un radical amino (-NH<sub>2</sub>),
- un radical alcoxy comportant de 1 à 6 atomes de carbone,
- une séquence peptidique de formule (XII) :

-Val- $\Sigma$ - $\Psi$  (XII)

dans laquelle  $\Sigma$  représente une séquence de formule (XIII) ou de formule (XIV) :

$$-(AA_6)-Trp\ Asn-(AA_7)-(AA_8) \quad (XIII)$$
$$-(AA_6)-Trp\ His-(AA_7)-(AA_8) \quad (XIV)$$

**dans lesquelles :**

- (AA<sub>6</sub>) représente un acide aminé différent de la lysine,
- (AA<sub>7</sub>) représente un acide aminé,
- (AA<sub>8</sub>) représente un résidu sérine ou thréonine,

et  $\Psi$  fixé sur le reste  $-\text{CO}-$  de l'acide aminé  $\text{AA}_8$  libre, représente un groupe  $\text{OH}$ ,  $\text{NH}_2$  ou un radical alcoxy comportant de 1 à 6 atomes de carbone.

- une séquence peptidique de formule (XV) :

-Val-Ψ (XV)

dans laquelle  $\Psi$  fixé sur le reste -CO- de la valine, a la même signification que pour la formule (XII),

- ou une séquence peptidique de formule (XVI) à (XVIII) :

**-Z-TrpGlyCys- $\Theta$ -CysTyrThrSer- $\Psi$**  (XVI)

Val-Σ-Z-TrpGlyCys-Θ-CysTyrThrSerVal-Σ-Ψ (XVII)

Val-Z-TrpGlyCys- $\Theta$ -CysTyrThrSerVal- $\Psi$  (XVIII)

dans lesquelles  $Z$  et  $\Theta$  ont la définition donnée pour la formule (I) et  $\Sigma$  a la définition donnée pour la formule (XII) et  $\Psi$  fixé sur le reste

-CO- de la sérine, sur le reste -CO- de l'acide aminé AA<sub>8</sub> ou sur le reste -CO- de la valine, a la même signification que pour la formule (XII).

- 5 2. Peptides synthétiques de formule (I) selon la revendication 1, dans laquelle (AA<sub>5</sub>) représente soit un résidu valine, soit un résidu leucine, soit un résidu thréonine et lorsque  $\Omega$  correspond à une séquence peptidique de formule (XII) ou (XIV), (AA<sub>6</sub>) représente soit un résidu glutamine, soit un résidu arginine.
- 10 3. Peptides synthétiques de formule (I), selon la revendication 1, dans laquelle :
- $\Delta$  représente un radical biotinyle, un atome d'hydrogène, ou une chaîne aliphatique pouvant contenir une ou deux fonctions thiol, aldéhyde ou amine, la chaîne aliphatique étant de préférence une chaîne alkyle de 1 à 6 atomes de
- 15 carbone, ou une chaîne aminoalkylcarbonyle de 2 à 6 atomes de carbone,
- Z représente une séquence peptidique de formule (II) ou (V) dans lesquelles  $\Xi_1$  représente une séquence peptidique de deux acides aminés et  $\Xi_2$  représente un acide aminé, ou une séquence de formule (IV) dans laquelle  $\Xi_1$  représente trois acides aminés, ou une séquence peptidique de formule (VIII)
- 20 dans laquelle  $\Xi_1$  représente une séquence peptidique de neuf, huit ou trois acides aminés et  $\Xi_2$  une séquence peptidique de cinq acides aminés,
- $\Theta$  représente une séquence peptidique de formule :
- Lys Gly Arg Leu Val-,  
-Arg Gly Lys Ala Val-,  
- Arg Gly Arg Leu Val-,  
ou  
-Arg Gly Arg Ala Val-,  
et
- 30 - $\Omega$  représente un groupe hydroxyle, la séquence peptidique (XV) ou une des séquences suivantes qui correspondent à la séquence peptidique de formule (XII) :
- Val Arg Trp Asn Glu Thr- $\Psi$ ,  
- Val Gln Trp Asn Glu Thr- $\Psi$   
ou  
- Val Gln Trp Asn Ser Thr- $\Psi$ .
4. Peptides synthétiques de formule (I), selon l'une des revendications 1 à 3, dans laquelle Z représente une séquence peptidique de formule :

- -Leu Leu Ser Ser-
- -Leu Leu Asn Ser-
- -Arg Leu Asn Ser-
- -Ala Leu Glu Thr Leu Leu Gln Asn Gln Gln Leu Leu Asn Ser-
- 5 • -Ala Leu Glu Thr Leu Leu Gln Asn Gln Gln Leu Leu Asp Leu-
- -Ala Leu Glu Thr Leu Leu Gln Asn Gln Gln Leu Leu Asn Ile -
- -Leu Asn Gln Gln Arg Leu Leu Asn Ser-
- ou
- -Arg Ala Leu Glu Thr Leu Leu Asn Gln Gln Arg Leu Leu Asn Ser-

10

5. Peptides synthétiques de 20 à 50 acides aminés selon la revendication 1, de formule (Ia) :



15

dans laquelle  $\text{Z}_a$  représente un radical de formules IIa à Xa :

- |    |                                |         |
|----|--------------------------------|---------|
|    | $\Xi_{1a}\text{-Ser-}\Xi_{2a}$ | (IIa)   |
|    | $\text{-Ser-}\Xi_{2a}$         | (IIIa)  |
|    | $\text{-}\Xi_{1a}\text{-Ser}$  | (IVa)   |
| 20 | $\Xi_{1a}\text{-Gln-}\Xi_{2a}$ | (Va)    |
|    | $\text{-Gln-}\Xi_{2a}$         | (VIa)   |
|    | $\Xi_{1a}\text{-Gln-}$         | (VIIa)  |
|    | $\Xi_{1a}\text{-Asn-}\Xi_{2a}$ | (VIIIa) |
|    | $\text{-Asn-}\Xi_{2a}$         | (IXa)   |
| 25 | $\text{-}\Xi_{1a}\text{-Asn}$  | (Xa)    |

dans lesquelles :

- $\Xi_{1a}$  représente une séquence peptidique de 1 à 5 acides aminés
- et
- $\Xi_{2a}$  un acide aminé,
- 30 - $\Omega_a$  représente une séquence peptidique de formule (XII), telle que définie pour la formule (I), ou une séquence peptidique de formule (XVIIa) :

35



et

$\Delta$ ,  $\Theta$ ,  $\Sigma$  et  $\Psi$  ont la même signification que pour la formule (I).

6. Peptides synthétiques de formule (I) selon l'une des revendications 1 à 5 incluant l'une des séquences suivantes :

Séquence N° 1

5 -LLSLWGCRGKAVCYTSVQWNET-

ou

-Leu Leu Ser Leu Trp Gly Cys Arg Gly Lys Ala Val Cys Tyr Thr Ser Val Gln Trp Asn

1 5 10 15 20

Glu Thr-

10 22

Séquence N° 2

-LLSLWGCRGRLVCYTSVQWNET-

ou

15 -Leu Leu Ser Leu Trp Gly Cys Arg Gly Arg Leu Val Cys Tyr Thr Ser Val Gln Trp Asn

1 5 10 15 20

Glu Thr-

22

20 Séquence N° 3

-LLSSWGCKGRLVCYTSVQWNET-

ou

-Leu Leu Ser Ser Trp Gly Cys Lys Gly Arg Leu Val Cys Tyr Thr Ser Val Gln Trp Asn

1 5 10 15 20

25 Glu Thr-

22

Séquence N° 4

-LLSSWGCKGRLVCYTSVQWNST-

30 ou

-Leu Leu Ser Ser Trp Gly Cys Lys Gly Arg Leu Val Cys Tyr Thr Ser Val Gln Trp Asn

1 5 10 15 20

Ser Thr-

22

35

Séquence N° 5

-LLQSWGCKGRLVCYTSVQWNST-

ou

43

-Leu Leu Gln Ser Trp Gly Cys Lys Gly Arg Leu Val Cys Tyr Thr Ser Val Gln Trp Asn  
 1 5 10 15 20

Ser Thr-

22

5

Séquence N° 6

-LLNSWGCRGKAVCYTSVQWNET-

ou

-Leu Leu Asn Ser Trp Gly Cys Arg Gly Lys Ala Val Cys Tyr Thr Ser Val Gln Trp Asn

10 1 5 10 15 20

Glu Thr-

22

Séquence N° 7

15 -LLSLWGCRGRAVCYTSVQWNET-

ou

-Leu Leu Ser Leu Trp Gly Cys Arg Gly Arg Ala Val Cys Tyr Thr Ser Val Gln Trp Asn

1 5 10 15 20

Glu Thr-

20 22

Séquence N° 8

-LLSSWGCRGRLVCYTSVQWNET-

ou

25 -Leu Leu Ser Ser Trp Gly Cys Arg Gly Arg Leu Val Cys Tyr Thr Ser Val Gln Trp Asn

1 5 10 15 20

Glu Thr-

22

30 Séquence N° 9 :

-LLSSWGCKGRLVCYTS-

ou

-Leu Leu Ser Ser Trp Gly Cys Lys Gly Arg Leu Val Cys Tyr Thr Ser-

1 5 10 15

35

Séquence N° 10 :

-LLNSWGCKGRLVCYTS-

ou

44

-Leu Leu Asn Ser Trp Gly Cys Lys Gly Arg Leu Val Cys Tyr Thr Ser-

1 5 10 15

Séquence N° 11 :

5 -ALETLLQNQQLLNSWGCRGRLVCYTSVRWNET-

ou

-Ala Leu Glu Thr Leu Leu Gln Asn Gln Gln Leu Leu Asn Ser Trp Gly Cys Arg Gly

1 5 10 15

Arg Leu Val Cys Tyr Thr Ser Val Arg Trp Asn Glu Thr-

10 20 25 30

Séquence N° 12 :

-ALETLLQNQQLLNIWGCRGRLVCYTSVRWNET-

ou

15 -Ala Leu Glu Thr Leu Leu Gln Asn Gln Gln Leu Leu Asn Ile Trp Gly Cys Arg Gly

1 5 10 15

Arg Leu Val Cys Tyr Thr Ser Val Arg Trp Asn Glu Thr-

20 25 30

20 Séquence N° 13 :

-ALETLLQNQQLLDLWGCRGRLVCYTSVRWNET-

ou

-Ala Leu Glu Thr Leu Leu Gln Asn Gln Gln Leu Leu Asp Leu Trp Gly Cys Arg Gly

1 5 10 15

25 Arg Leu Val Cys Tyr Thr Ser Val Arg Trp Asn Glu Thr-

20 25 30

Séquence N° 14 :

-LNQQRLLNSWGCKGRLVCYTSV-

30 ou

-Leu Asn Gln Gln Arg Leu Leu Asn Ser Trp Gly Cys Lys Gly Arg Leu Val Cys Tyr

1 5 10 15

Thr Ser Val-

20

35

Séquence N° 15 :

-RALETLLNQQRLLNSWGCKGRLVCYTSV-

ou



45

- Arg Ala Leu Glu Thr Leu Leu Asn Gln Gln Arg Leu Leu Asn Ser Trp Gly Cys

1

5

10

15

Lys Gly Arg Leu Val Cys Tyr Thr Ser Val-

20

25

5

Séquence N° 16 :

-RLNSWGCKGRLVCYTSV-

ou

- Arg Leu Asn Ser Trp Gly Cys Lys Gly Arg Leu Val Cys Tyr Thr Ser Val-

10

1

5

10

15

7. Peptides synthétiques, selon l'une des revendications 1 à 6, de séquence :

15 PEPTIDE N° 1 (2B)

LLSLWGCRGKAVCYTSVQWNET

ou

Leu Leu Ser Leu Trp Gly Cys Arg Gly Lys Ala Val Cys Tyr Thr Ser Val Gln Trp Asn

1

5

10

15

20

20 Glu Thr

22

PEPTIDE N° 2 (3B)

LLSLWGCRGRLVCYTSVQWNET

25 ou

Leu Leu Ser Leu Trp Gly Cys Arg Gly Arg Leu Val Cys Tyr Thr Ser Val Gln Trp Asn

1

5

10

15

20

Glu Thr

22

30

PEPTIDE N° 3 (4B)

LLSSWGCKGRLVCYTSVQWNET

ou

Leu Leu Ser Ser Trp Gly Cys Lys Gly Arg Leu Val Cys Tyr Thr Ser Val Gln Trp Asn

35

1

5

10

15

20

Glu Thr

22

46

PEPTIDE N° 4 (5B)

LLSSWGCKGRLVCYTSVQWNST

ou

Leu Leu Ser Ser Trp Gly Cys Lys Gly Arg Leu Val Cys Tyr Thr Ser Val Gln Trp Asn

5      1                      5                      10                      15                      20

Ser Thr

22

PEPTIDE N° 5 (6B)

10 LLQSWGCKGRLVCYTSVQWNST

ou

Leu Leu Gln Ser Trp Gly Cys Lys Gly Arg Leu Val Cys Tyr Thr Ser Val Gln Trp Asn

1                      5                      10                      15                      20

Ser Thr

15      22

PEPTIDE N° 6

LLNSWGCRGKAVCYTSVQWNET

ou

20 Leu Leu Asn Ser Trp Gly Cys Arg Gly Lys Ala Val Cys Tyr Thr Ser Val Gln Trp Asn

1                      5                      10                      15                      20

Glu Thr

22

25 PEPTIDE N° 7

LLSLWGCRGRAVCYTSVQWNET

ou

Leu Leu Ser Leu Trp Gly Cys Arg Gly Arg Ala Val Cys Tyr Thr Ser Val Gln Trp Asn

1                      5                      10                      15                      20

30 Glu Thr

22

PEPTIDE N° 8 (7B)

LLSSWGCRGRLVCYTSVQWNET

35 ou

47

Leu Leu Ser Ser Trp Gly Cys Arg Gly Arg Leu Val Cys Tyr Thr Ser Val Gln Trp Asn  
 1 5 10 15 20

Glu Thr

22

5

PEPTIDE N° 9 (12B)

LLSSWGCKGRLVCYTS

ou

Leu Leu Ser Ser Trp Gly Cys Lys Gly Arg Leu Val Cys Tyr Thr Ser

10 1 5 10 15

PEPTIDE N° 10 (14B)

LLNSWGCKGRLVCYTS

ou

15 Leu Leu Asn Ser Trp Gly Cys Lys Gly Arg Leu Val Cys Tyr Thr Ser

1 5 10 15

PEPTIDE N° 11 (18B)

ALETLLQNQQLLSWGCRGRLVCYTSVRWNET

20 ou

Ala Leu Glu Thr Leu Leu Gln Asn Gln Gln Leu Leu Asn Ser Trp Gly Cys Arg Gly

1 5 10 15

Arg Leu Val Cys Tyr Thr Ser Val Arg Trp Asn Glu Thr

20 25 30

25

PEPTIDE N° 12 (19B)

ALETLLQNQQLLNWGCGRGRLVCYTSVRWNET

ou

Ala Leu Glu Thr Leu Leu Gln Asn Gln Gln Leu Leu Asn Ile Trp Gly Cys Arg Gly

30 1 5 10 15

Arg Leu Val Cys Tyr Thr Ser Val Arg Trp Asn Glu Thr

20 25 30

48

PEPTIDE N° 13 (20B)

ALETLLQNQQLLDLWGCRGRLVCYTSVRWNET

ou

-Ala Leu Glu Thr Leu Leu Gln Asn Gln Gln Leu Leu Asp Leu Trp Gly Cys Arg Gly

5      1                      5                      10                      15

Arg Leu Val Cys Tyr Thr Ser Val Arg Trp Asn Glu Thr

20                      25                      30

PEPTIDE N° 14 (21B)

10 LNQQRLLNSWGCKGRLVCYTSV

ou

Leu Asn Gln Gln Arg Leu Leu Asn Ser Trp Gly Cys Lys Gly Arg Leu Val Cys Tyr

1                      5                      10                      15

Thr Ser Val

15 20

PEPTIDE N° 15 (22B)

RALETLLNQQRLLNSWGCKGRLVCYTSV

ou

20 Arg Ala Leu Glu Thr Leu Leu Asn Gln Gln Arg Leu Leu Asn Ser Trp Gly Cys Lys

1                      5                      10                      15

Gly Arg Leu Val Cys Tyr Thr Ser Val

20                      25

25 PEPTIDE N° 16 (23B)

RLNSWGCKGRLVCYTSV

ou

Arg Leu Asn Ser Trp Gly Cys Lys Gly Arg Leu Val Cys Tyr Thr Ser Val

1                      5                      10                      15

30

8. Composition contenant un ou plusieurs peptides synthétiques de formule (I) selon l'une quelconque des revendications 1 à 7.

9. Composition selon la revendication 8 contenant le peptide N° 3 (4B) et le peptide N° 1 (2B).

35

10. Composition contenant un ou plusieurs peptides synthétiques de formule (I) selon la revendication 1 et un ou plusieurs peptides recombinés VIH-1 du groupe O.
- 5 11. Composition contenant un ou plusieurs peptides synthétiques de formule (I), selon la revendication 1, et un ou plusieurs peptides synthétiques ou recombinés VIH-1 et/ou VIH-2.
12. Procédé d'immunodosage mettant en oeuvre un ou plusieurs peptides  
10 synthétiques de formule (I), selon l'une quelconque des revendications 1 à 7.
13. Procédé d'immunodosage mettant en oeuvre une composition selon l'une quelconque des revendications 8 à 11.
- 15 14. Trousse de diagnostic incluant au moins un peptide synthétique de formule (I), selon l'une quelconque des revendications 1 à 7, ou une composition selon l'une quelconque des revendications 8 à 11.

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 98/00691

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 C07K14/16 C12N7/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C07K A61K C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 96 12809 A (PASTEUR INSTITUT ;CHARNEAU PIERRE (FR); CLAVEL FRANCOIS (FR); BORM) 2 May 1996 cited in the application Peptide n. 18 see page 23 see claims 36-39 ----	1-14
X	WO 96 27013 A (INST NAT SANTE RECH MED ;ASSIST PUBL HOPITAUX DE PARIS (FR); SIMON) 6 September 1996 SEQ ID 68 see page 46 see the whole document ----	1-9, 12-14
Y		10, 11
	-/--	

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

### \* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

9 September 1998

Date of mailing of the international search report

21/09/1998

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Fuhr, C

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 98/00691

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 95 32293 A (INT MUREX TECH CORP ;DUNCAN RICHARD JULIAN STUART (GB)) 30 November 1995 cited in the application see page 5, line 20 - page 6, line 14 -----	10,11
A	WO 96 27012 A (AKZO NOBEL NV ;KOOLEN MARCUS JOSEPHUS MARIE (NL); SCHIELEN WILHELM) 6 September 1996 see the whole document -----	

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR 98/00691

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
- WO 9612809	A	02-05-1996	FR 2726006 A	26-04-1996
			FR 2731225 A	06-09-1996
			AU 3808995 A	15-05-1996
			CA 2202408 A	02-05-1996
			EP 0787191 A	06-08-1997
			ZA 9508878 A	21-05-1996
WO 9627013	A	06-09-1996	FR 2731013 A	30-08-1996
			CA 2214102 A	06-09-1996
			EP 0812359 A	17-12-1997
WO 9532293	A	30-11-1995	AU 2530795 A	18-12-1995
WO 9627012	A	06-09-1996	AU 5100696 A	18-09-1996



# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Der le Internationale No  
PCT/FR 98/00691

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE  
CIB 6 C07K14/16 C12N7/00

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

## B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)  
CIB 6 C07K A61K C12N

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)

## C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	WO 96 12809 A (PASTEUR INSTITUT ; CHARNEAU PIERRE (FR); CLAVEL FRANCOIS (FR); BORM) 2 mai 1996 cité dans la demande Peptide n. 18 voir page 23 voir revendications 36-39 ---	1-14
X	WO 96 27013 A (INST NAT SANTE RECH MED ; ASSIST PUBL HOPITAUX DE PARIS (FR); SIMON) 6 septembre 1996 SEQ ID 68 voir page 46 voir le document en entier ---	1-9, 12-14
Y		10, 11
	--- -/--	

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

\* Catégories spéciales de documents cités:

- "A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- "T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- "X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- "Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- "&" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

9 septembre 1998

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

21/09/1998

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale  
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Fuhr, C

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Der. Internationale No

PCT/FR 98/00691

## C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
Y	WO 95 32293 A (INT MUREX TECH CORP ;DUNCAN RICHARD JULIAN STUART (GB)) 30 novembre 1995 cité dans la demande voir page 5, ligne 20 - page 6, ligne 14 ---	10,11
A	WO 96 27012 A (AKZO NOBEL NV ;KOOLEN MARCUS JOSEPHUS MARIE (NL); SCHIELEN WILHELM) 6 septembre 1996 voir le document en entier -----	

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Der. le Internationale No

PCT/FR 98/00691

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
- WO 9612809 A	02-05-1996	FR 2726006 A	26-04-1996
		FR 2731225 A	06-09-1996
		AU 3808995 A	15-05-1996
		CA 2202408 A	02-05-1996
		EP 0787191 A	06-08-1997
		ZA 9508878 A	21-05-1996
WO 9627013 A	06-09-1996	FR 2731013 A	30-08-1996
		CA 2214102 A	06-09-1996
		EP 0812359 A	17-12-1997
WO 9532293 A	30-11-1995	AU 2530795 A	18-12-1995
WO 9627012 A	06-09-1996	AU 5100696 A	18-09-1996

Formulaire PCT/ISA/210 (annexe familles de brevets) (juillet 1992)

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**